

# Correlation Between The Level of Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp in Serum And Aortic Tissue With The Number of Foam Cells at Atherogenesis Process in Wistar Rats

Retno Susilowati<sup>1</sup>, Djanggan Sargowo<sup>2</sup>, Rasjad Indra<sup>2</sup>,  
Askandar Tjokropawiro<sup>3</sup>, Sri Widyarti<sup>4</sup>

**Background.** Atherogenesis was initiated by cholesterol deposits on foam cell in sub intima of blood vessel stress oxidation. Atherogenesis in non-hypercholesterolemia usually undergoes an increased level of Lp-PLA<sub>2</sub>. It, therefore, needs to evaluate the role of Lp-PLA<sub>2</sub> in the foam cell formation.

**Aims.** To explain the role of Lp-PLA<sub>2</sub> in the foam cell forming, to correlate the level of Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp in aorta with foam cell number (FCs) as well as to correlate the level of Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp contents in serum with their contents in aorta and the correlation with FCs.

**Methods.** 30 rats aged 2 months, with their weight averaging from 150-200g, were divided into the control group and the treatment one where the latter was fed hyperlipidemia for 2, 8 and 12 weeks. The measurement level of LDL-C, MDA, F<sub>2</sub>-Isp and Lp-PLA<sub>2</sub> in serum was performed as well as aorta and FCs. Data was analysed using anova, t-Test, path analysis and correlation.

**Results.** Research result indicated that: (1) The level of MDA<sub>(a)</sub>, F<sub>2</sub>-Isp<sub>(s)</sub> and Lp-PLA<sub>2(s)</sub> positively correlated with FCs, Lp-PLA<sub>2(s)</sub> having the highest correlation value. (2) Lp-PLA<sub>2(a)</sub>, MDA<sub>(s)</sub> and F<sub>2</sub>-Isp<sub>(s,a)</sub> did not correlate with FCs. (3) There was a positive correlation between Lp-PLA<sub>2</sub> with MDA and F<sub>2</sub>-Isp in both serum and aorta.

**Conclusion.** The enzyme of Lp-PLA<sub>2</sub> acts as an activator in forming the foam cell with stimulated stress oxidation.

(J Kardiologi Indones. 2012;33:227-35)

**Keywords:** Atherogenesis, MDA, F<sub>2</sub>-Isp, Lp-PLA<sub>2</sub>

<sup>1</sup>Faculty of Science and Technology  
Islamic State University of Malang

<sup>2</sup>Faculty of Medicine Brawijaya  
University

<sup>3</sup>Faculty of Medicine Airlangga  
University

<sup>4</sup>Faculty of Science Brawijaya  
University

## Korelasi Antara Kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp di Serum dan Jaringan Aorta dengan Jumlah Sel Busa dalam Proses Aterogenesis pada tikus Wistar

Retno Susilowati<sup>1</sup>, Djangan Sargowo<sup>2</sup>, Rasjad Indra<sup>2</sup>,  
Askandar Tjokprawiro<sup>3</sup>, Sri Widyarti<sup>4</sup>

**Latar belakang.** Aterogenesis diawali dengan penimbunan kolesterol dalam sel busa di sub intima dinding arteri kondisi stress oksidasi. Aterogenesis individu non hiperkolesterol biasanya mengalami peningkatan kadar Lp-PLA<sub>2</sub> sehingga perlu dikaji peran Lp-PLA<sub>2</sub> pada pembentukan sel busa.

**Tujuan.** Menjelaskan peran Lp-PLA<sub>2</sub> pada pembentukan sel busa, menentukan korelasi antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp di aorta dengan jumlah sel busa (FCs). Menentukan korelasi antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp di serum dengan kadarnya di aorta serta korelasinya dengan FC<sub>s</sub>.

**Metodologi.** Tiga puluh tikus berusia 2 bulan dengan berat badan 150-200g, dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok perlakuan yang diberi pakan hiperlipidemik selama 2, 8 dan 12 minggu. Dilakukan pengukuran kadar LDL-C, MDA, F<sub>2</sub>-isp dan Lp-PLA<sub>2</sub> di serum dan aorta, serta FCs. Data dianalisis anova, uji t, analisis jalur dan korelasi.

**Hasil.** Hasil penelitian menunjukkan: (1) Kadar MDA<sub>(a)</sub>, F<sub>2</sub>-Isp<sub>(s)</sub> dan Lp-PLA<sub>2(s)</sub> berkorelasi positif dengan FCs, Lp-PLA<sub>2(s)</sub> memiliki nilai korelasi tertinggi. (2) Lp-PLA<sub>2(a)</sub>, MDA<sub>(s)</sub> dan F<sub>2</sub>-Isp<sub>(s,a)</sub> tidak berkorelasi dengan FCs. (3) Lp-PLA<sub>2</sub> berkorelasi positif dengan MDA dan F<sub>2</sub>-Isp baik di serum maupun aorta.

**Kesimpulan.** Enzim Lp-PLA<sub>2</sub> berperan sebagai aktivator pada pembentukan sel busa dengan menstimulasi stress oksidasi.

(J Kardiol Indones. 2012;33:227-35)

**Kata kunci:** Aterogenesis, MDA, F<sub>2</sub>-Isp, Lp-PLA<sub>2</sub>

Aterosklerosis masih menjadi penyebab mortalitas dan morbiditas di semua negara termasuk Indonesia. Plak ateroma adalah hasil reaksi inflamasi kronik yang terjadi pada kondisi stress oksidasi selama puluhan tahun, menjadi etiologi primer kejadian stroke dan infark miokardial. Perkembangan aterosklerosis dapat

dibedakan menjadi 4 tahap yaitu tahap pembentukan sel busa, *fattysreak*, plak ateroma dan *rupture*. Proses aterogenesis dimulai oleh deposit lipid khususnya kolesterol dan kolesterol ester didalam makrofag di jaringan pembuluh darah yang dikenal sebagai sel busa atau *foam cell* (FC).

Hiperkolesterol merupakan faktor risiko klasik utama aterosklerosis disamping faktor usia<sup>1</sup> karena 30-40% bagian dari plak aterosklerosis tersusun oleh kristal kolesterol bebas, ester kolesterol dan lipid

**Corresponding Address:**

Dr. Retno Susilowati, MSi. E-mail: [susilowati\\_pd@yahoo.com](mailto:susilowati_pd@yahoo.com)

peroksida.<sup>2</sup> Namun, akhir-akhir ini terjadi kontroversi terkait hiperkolesterol sebagai faktor risiko utama aterosklerosis. Data menunjukkan bahwa sebanyak 50% penderita komplikasi aterosklerosis seperti *myocardial infarction* tidak memiliki faktor risiko klasik tersebut<sup>3</sup> dan sebanyak 35-40% dari seluruh kasus CHD ternyata pasien memiliki kadar total kolesterol normal.<sup>1</sup> Dengan demikian perlu kajian biomarker nonkonvensional yang banyak ditemukan dalam serum namun erat kaitannya dengan proses aterogenesis.

Enzim *lipoprotein-associated phospholipase A<sub>2</sub>* (Lp-PLA<sub>2</sub>) memiliki nama lain *platelet activating factor acetylhydrolase* (PAF-AH) adalah enzim yang dihasilkan dan disekresikan oleh makrofag sebagai respon terhadap pembentukan lipid peroksida khususnya senyawa PAF dan peroksida fosfolin. Dalam sirkulasi Lp-PLA<sub>2</sub> darah terikat pada apoB dari LDL.<sup>4</sup>

Berbagai faktor risiko klasik aterosklerosis berkorelasi positif dengan kadar Lp-PLA<sub>2</sub> plasma yaitu hiperkolesterol,<sup>5</sup> diabetes,<sup>6</sup> hipertensi<sup>7</sup> dan sindrom metabolik.<sup>6,8</sup> Data epidemiologi menunjukkan Lp-PLA<sub>2</sub> terlibat dengan *cardiovascular disease* (CVD) baik pada individu hiperkolesterol maupun normokolesterol.<sup>9</sup> Dengan demikian peningkatan Lp-PLA<sub>2</sub> plasma merupakan parameter yang diduga dapat dijadikan biomarker aterogenesis lebih tepat karena memiliki hubungan erat dengan stress oksidasi, disfungsi endotel dan inflamasi.

Pengukuran kadar *malondialdehyde* (MDA) maupun F<sub>2</sub>-Isoprostan (F<sub>2</sub>-Isp) dalam plasma pada aterosklerosis tingkat lanjut menunjukkan adanya peningkatan secara signifikan,<sup>10,11,12</sup> demikian juga enzim Lp-PLA<sub>2</sub>, kadarnya dalam plasma telah diketahui berkorelasi dengan kasus CAD.<sup>13,14</sup> Namun demikian, hubungan antara kadar enzim Lp-PLA<sub>2</sub> dalam proses aterogenesis khususnya pada fase pembentukan sel busa dibandingkan dengan marker stress oksidasi lain seperti MDA dan F<sub>2</sub>-Isp belum diketahui dengan pasti. Pengamatan secara sistematis dengan destruksi pembuluh darah tidak memungkinkan dilakukan pada pasien, sehingga penelitian ini menggunakan tikus sebagai hewan coba.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui korelasi diantara kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp di jaringan aorta dan kadar LDL-C serum dengan jumlah sel busa; mengetahui korelasi antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA, F<sub>2</sub>-Isp di serum dengan kadarnya di aorta dan dengan jumlah sel busa.

## Subyek dan Metode Penelitian

Sebanyak 30 ekor tikus wistar jantan umur 4-6 minggu, berat badan 150-200 gram dikelompokkan menjadi 6 yaitu kelompok pakan normal dan hiperlipidemic serta 3 lama konsumsi 2,8 dan 12 minggu.

Pada akhir perlakuan, sampel darah diambil dari jantung, disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan serum, serum disimpan pada suhu -20°C. Pembuluh aorta dicuci dengan PBS kemudian dibuat preparat *fresh frozen section* dengan pewarna Oil red O, bagian lainya dihomogenasi untuk mendapatkan homogenat jaringan aorta. Dilakukan penentuan kadar LDL-C serum dengan metode penghitungan menggunakan rumus Fiedwall. Selain itu, pada serum dan homogenat jaringan aorta juga dilakukan pengukuran kadar MDA dengan metode *TBA test*, pengukuran kadar Lp-PLA<sub>2</sub> dan F<sub>2</sub>-Isp dengan metode Elisa. Data dianalisis anova, analisis jalur dan analisis korelasi.

## Hasil Penelitian

Lama pemberian pakan berpengaruh sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) terhadap jumlah sel busa dan kadar LDL-C serum. Lama pemberian pakan juga berpengaruh sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) terhadap kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA dan F<sub>2</sub>-Isp di aorta dan serum. Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> di aorta meningkat sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) dari 135,78 ± 24,94 ng/mL pada minggu ke-2 menjadi 184,23 ± 27,18 ng/mL pada minggu ke-8, perbedaan tidak signifikan antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub> minggu ke-8 dengan minggu ke-12 (195,54 ± 23,61 ng/mL). Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> di serum meningkat sangat signifikan ( $p < 0,01$ ) dari 139,25 ± 33,39 ng/mL pada minggu ke-2 menjadi 236,04 ± 31,71 ng/mL pada minggu ke-8, perbedaan tidak signifikan antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub> minggu ke-8 dengan minggu ke-12 (234,86 ± 22,59 ng/mL) (Tabel dan Gambar 1).

Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> korelasi positif sangat signifikan ( $r = 0,49$ ;  $p < 0,01$ ) dengan kadar MDA di aorta dan di serum ( $r = 0,37$ ;  $p < 0,05$ ). Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> serum berkorelasi sangat signifikan dengan kadarnya di aorta ( $r = 0,62$ ;  $p < 0,01$ ) dan dengan jumlah sel busa ( $r = 0,56$ ;  $p < 0,01$ ). Kadar F<sub>2</sub>-Isp serum berkorelasi ( $r = 0,37$ ;  $p < 0,05$ ) dengan jumlah sel busa dan berkorelasi ( $p < 0,05$ ) dengan kadarnya dalam serum (Tabel 2).

Hasil uji kelayakan, menunjukkan model memiliki kriteria baik (GFI = 0,923 ≥ 0,90 dan  $X^2_6,74 \leq$

7,82). Berdasarkan koefisien regresi, LDL berpengaruh sangat signifikan ( $\beta=0,046$ ;  $p<0,01$ ) dengan kadar MDA dan ( $\beta=0,390$ ;  $p<0,01$ ) dengan  $F_2$ -Isp dalam aorta, kadar MDA aorta berpengaruh sangat signifikan ( $\beta=3,37$ ;  $P<0,01$ ) dengan jumlah sel busa. namun demikian kadar LDL,  $F_2$ -Isp dan Lp-PLA<sub>2</sub> dala aorta berpengaruh tidak signifikan ( $p>0,05$ ) dengan jumlah sel busa (Tabel 3). Berdasarkan nilai *standardized coefficient* (Gambar 2), kontribusi dari kadar MDA aorta terhadap jumlah sel busa adalah paling kuat dibandingkan dengan kadar LDL serum, Lp-PLA<sub>2</sub> dan  $F_2$ -Isp aorta.

## Pembahasan

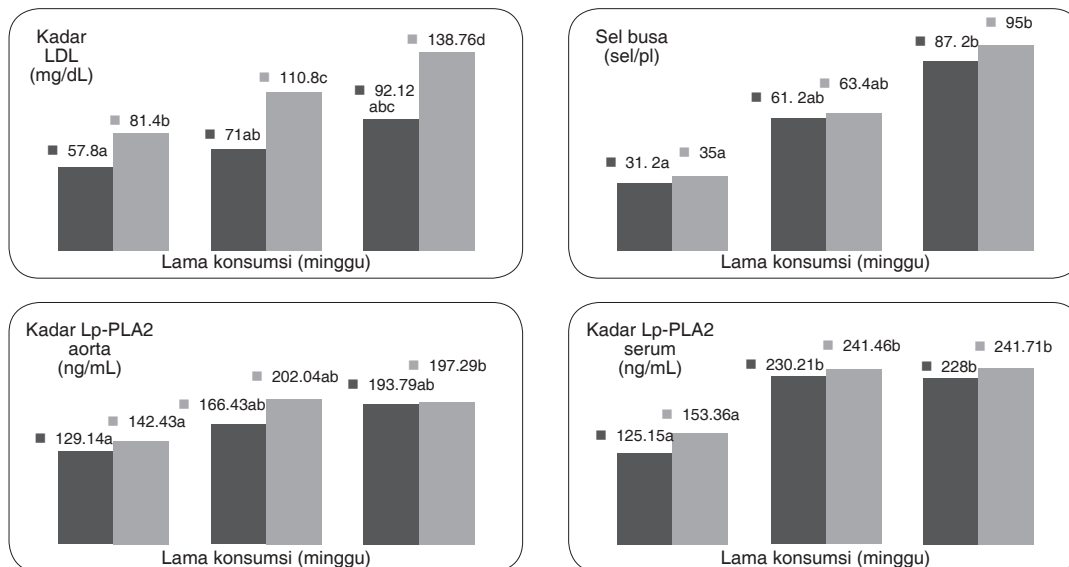
### Korelasi diantara Kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, MDA dan $F_2$ -Isp Aorta dan Kadar LDL Serum serta korelasinya dengan Jumlah Sel Busa

Lama pemberian pakan pada penelitian ini menimbulkan 3 faktor risiko aterosklerosis yaitu meningkatnya metabolisme lipid, stress oksidasi dan inflamasi seperti ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1. Kadar LDL berpengaruh sangat signifikan dengan kadar MDA ( $\beta=0,046$ ) dan  $F_2$ Isp ( $\beta=0,39$ ) (Tabel 3). Hal ini

Tabel 1. Karakteristik data masing-masing variabel penelitian

Variabel	Lama konsumsi 2 minggu		Lama konsumsi 8 minggu		Lama konsumsi 12 minggu	
	Pakan normal	Pakan hiperlipidemik	Pakan normal	Pakan hiperlipidemik	Pakan normal	Pakan hiperlipidemik
Jml sel busa	31,00 ± 28,28a	35,00 ± 28,28a	61,20 ± 42,32ab	63,40 ± 31,89ab	87,20 ± 31,48b	95,00 ± 32,79b
LDL serum	57,80 ± 6,76a	81,40 ± 6,88b	21,00 ± 3,32ab	110,80 ± 8,26c	92,12 ± 16,71abc	138,76 ± 8,04d
MDA aorta	2,85 ± 1,48a	5,16 ± 0,95b	17,40 ± 3,81d	10,25 ± 2,26c	14,39 ± 3,77cd	12,47 ± 2,41cd
$F_2$ -Isp aorta	156 ± 31,17a	179,30 ± 10,49ab	177,45 ± 10,77ab	203,20 ± 24,42b	165,15 ± 30,48a	188,80 ± 31,70ab
Lp-PLA <sub>2</sub> aorta	129,14 ± 29,38a	142,43 ± 20,64a	166,43 ± 24,44ab	202,04 ± 16,52ab	143,79 ± 34,72ab	197,29 ± 6,39ab
MDA serum	2,11 ± 0,56a	2,24 ± 0,54a	2,11 ± 0,79a	5,25 ± 2,01b	2,27 ± 0,50a	2,75 ± 0,47a
$F_2$ -Isp serum	159,15 ± 14,96a	180,52 ± 25,99ab	166,85 ± 36,31ab	205,05 ± 42,99b	167,20 ± 32,09ab	254,60 ± 10,01c
Lp-PLA <sub>2</sub> serum	125,15 ± 33,88a	153,36 ± 29,37a	230,21 ± 45,35b	241,86 ± 11,00b	228,00 ± 22,46b	241,71 ± 22,93b

Nilai rerata yang diikuti dengan notas huruf berbeda menunjukkan berbeda secara signifikan pada taraf kesalahan 0,05



**Gambar 1.** Kadar LDL dalam serum darah tikus (A). Jumlah sel busa di aorta perpenampang lintang aorta (B). Kadar enzim LpPLA<sub>2</sub> di jaringan aorta tikus (C) dan serum (D). Nilai rerata diatas bar yang diikuti dengan notas huruf yang berbeda menunjukkan berbeda secara bermakna pada taraf kesalahan 0,05. ■ Pakan normal ■ Pakan hiperlipidemik

Tabel 2. Hasil Uji Korelasi Antar Variabel

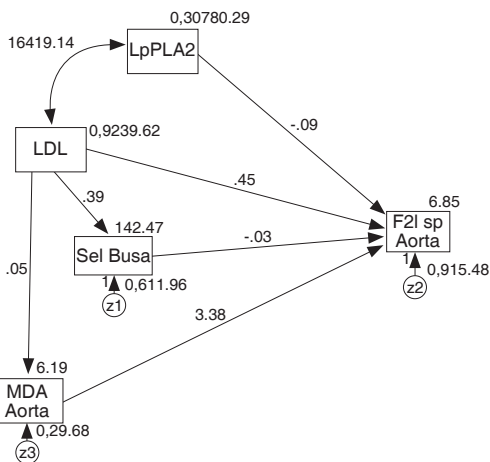
Korelasi antar variabel	Nilai korelasi Pearson (r)	Signifikansi(2 pihak)
Kadar Lp-PLA <sub>2</sub> aorta-MDA aorta	0,487	0,003**
Kadar Lp-PLA <sub>2</sub> aorta- kadar F <sub>2</sub> -Isp aorta	0,297	0,055
Kadar Lp-PLA <sub>2</sub> serum –MDA serum	0,374	0,021*
Kadar Lp-PLA <sub>2</sub> serum - F <sub>2</sub> -Isp serum	0,400	0,014*
Kadar MDA aorta –MDA serum	0,12	0,263
Kadar F <sub>2</sub> Isp aorta- F <sub>2</sub> Isp serum	0,342	0,032*
Kadar LpPLA <sub>2</sub> aorta-LpPLA <sub>2</sub> serum	0,624	0,000**
Kadar MDA serum-jumlah sel busa	0,214	0,128
Kadar F <sub>2</sub> Isp serum-Jumlah sel busa	0,373	0,021*
Kadar LpPLA <sub>2</sub> serum-jumlah sel busa	0,559	0,001*

Keterangan: Tanda \* menunjukkan signifikan pada kesalahan 0.05, \*\* menunjukkan signifikan pada kesalahan 0.01

Tabel 3. Hubungan regresi antar variabel data dalam aorta dengan jumlah sel busa

Hubungan		Koef. Reg (β)	SE	CR	p-value	Koef. Baku
Dari	Ke					
Intersep						
	MDA	6,185	1,012	6,114	0.000	
	F <sub>2</sub> ISP	142,470	4.594	31.014	0.000	
	Busa	6,849	33,456	0,205	0.838	
Jalur						
LDL	MDA	0.046	0.011	4.375	0.000 **	0.230
LDL	F2Isp	0.390	0.048	8.157	0.000 **	0,403
LPPLA	Busa	-0.089	0.140	-0.631	0.528 <sup>ns</sup>	-0.081
LDL	Busa	0.450	0.275	1.636	0.102 <sup>ns</sup>	0,327
F2Isp	Busa	-0.034	0.227	-0.150	0.881 <sup>ns</sup>	-0.024
MDA	busa	3.377	1.031	3.274	0.001**	0.492

Keterangan : ns = not significant (p-value > 0,05); \* = p-value < 0,05;\*\* = p-value < 0,01; SE = Standard Error; CR = Critical Ratio (Nilai kritis = Koef. Reg/SE)



Gambar 2. Model Struktural antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub>, LDL, MDA dan F<sub>2</sub>-Isp dengan Jumlah Sel Busa dalam bentuk unstandardized.

disebabkan karena senyawa prekursor pembentukan MDA dan F<sub>2</sub>Isp yaitu asam arakidonat banyak sebagai lapisan fosfolipid pada membran luar LDL.<sup>15</sup> Demikian juga faktor penyebab terjadinya konversi arachidonicacid (AA) menjadi MDA dan F<sub>2</sub>Isp yaitu stress oksidasi juga dapat distimulasi oleh peningkatan LDL dalam jaringan aorta.<sup>16</sup>

Asam lemak dari LDL dapat menstimulasi sel otot polos meningkatkan sintesis dermatan sulfat proteoglikan yang memiliki afinitas tinggi terhadap LDL.<sup>17</sup> Terikatnya LDL pada proteoglikan dalam jaringan menyebabkan LDL yang infiltrasi akan terperangkap lebih lama dalam jaringan dinding pembuluh darah.

Trigliserida dapat menstimulasi endotel menghasilkan ROS, sehingga jaringan dinding pembuluh darah sering mengalami stress oksidasi.<sup>17</sup> Hal ini menyebabkan senyawa lipid khususnya di lapisan luar LDL yang terperangkap di dalam jaringan pembuluh

darah, sangat potensial mengalami oksidasi sehingga terbentuk oxLDL dan lipid peroksida. Terdapat beberapa mekanisme yang memungkinkan terjadinya oksidasi secara *in vivo* yaitu oksidasi oleh peroksinitrit, NADPH oksidase, lipoksigenase,  $\text{Cu}^+$  dan superoksid produk sel fagosit dan mungkin sekali oksidasi non enzimatik.<sup>18</sup> Dengan bantuan enzim siklooksigenase AA dikonversi menjadi  $\text{PGG}_2$  dan selanjutnya  $\text{PGG}_2$  mengalami autooksidasi sehingga terbentuk  $\text{PGF}_2$  atau dikenal  $\text{F}_2$ -Isoprostan.<sup>16,19</sup> Korelasi LDL dengan  $\text{F}_2$ -Isp jauh lebih besar dibandingkan dengan kadar MDA karena karena  $\text{F}_2$ -Isp memiliki bentuk molekul yang jauh lebih stabil dibandingkan MDA sehingga  $\text{F}_2$ -Isp dapat mengalami peningkatan sebanding dengan peningkatan kadar LDL.

Hasil analisis jalur juga menunjukkan bahwa kadar MDA sebagai faktor yang berkorelasi paling kuat dengan koefisien terbesar ( $\beta=3,377$ ) dengan jumlah sel busa dibandingkan dengan kadar LDL,  $\text{F}_2$ Isp dan  $\text{LpPLA}_2$  (Tabel 3 dan Gambar 2). Hal ini dimungkinkan karena MDA merupakan petanda awal terjadinya stress oksidasi, yang menjadi kondisi kritis sebagai pemicu proses pembentukan sel busa.

Oksidasi LDL menyebabkan perubahan muatan apoB-100 sehingga LDL cenderung membentuk agregat dan fusi. oxLDL dapat berfungsi sebagai kemoatraktan sel inflamasi sehingga sel-sel inflamasi ini mengalami migrasi ke jaringan sub endotel, kemudian sel inflamasi mengekspresi *scavengerreceptor* (SR). Pembentukan agregat dan perubahan muatan LDL membuat LDL tidak dikenal reseptor *native*. Melalui SR seperti CD36 dan SR-A dan SRB makrofag memfagosit oxLDL tanpa down regulasi, sehingga terjadi penumpukan LDL dan terbentuklah makrofag sel busa. Afinitas LDL dalam bentuk agregat terhadap proteoglikan mengalami peningkatan dan memudahkan fagositosis pembentukan sel busa.<sup>20</sup>

Meskipun  $\text{F}_2$ Isp juga merupakan marker stress oksidasi seperti halnya MDA, namun MDA terbentuk lebih dahulu baru kemudian  $\text{F}_2$ -Isp. Kondisi ini diduga menjadi penyebab adanya perbedaan keeratan hubungan antara kadar  $\text{F}_2$ -Isp dan kadar MDA dengan jumlah sel busa pada perkembangan awal aterosklerosis pada penelitian ini. Tidak adanya korelasi  $\text{F}_2$ -Isp aorta dengan perkembangan aterosklerosis juga dijumpai pada penelitian Jenner *et al.*<sup>21</sup>

Pada hasil analisis jalur, kadar LDL berkorelasi tidak signifikan dengan jumlah sel busa (Tabel 3). Hal ini menunjukkan bahwa kondisi hiperlipidemik saja tidak cukup memfasilitasi terjadinya atherogenesis,

stress oksidasi lebih proaterogenik dibandingkan dengan hiperlipidemik saja tanpa stress oksidasi. Hal ini diduga sebagai faktor yang menyebabkan terjadinya inkonsistensi hubungan antara hiperkolesterol dengan aterosklerosis seperti yang ditemukan oleh Anand dan Myamoto.<sup>5,6</sup>

Hasil penelitian menunjukkan bahwa, kadar  $\text{LpPLA}_2$  aorta berpengaruh tidak signifikan dengan jumlah sel busa (Tabel 3). Hal ini diduga disebabkan karena aktifitas enzim  $\text{Lp-PLA}_2$  sangat dipengaruhi oleh kondisi stress oksidasi, hal ini didukung data yang menunjukkan adanya korelasi kadar  $\text{Lp-PLA}_2$  dengan kadar MDA (Tabel 2). Selain itu peran enzim  $\text{LpPLA}_2$  pada pembentukan sel busa adalah secara tidak langsung. Enzim  $\text{LpPLA}_2$  bersifat proinflamasi melalui pembentukan lisoPC, sehingga peran enzim  $\text{LpPLA}_2$  sangat tergantung kepada keberadaan PC dan kondisi stress oksidasi. Selain itu, diduga karena stabilitas enzim  $\text{LpPLA}_2$  sangat ditentukan oleh ketersediaan apoB sebagai *bindingprotein*, sehingga tingginya kadar  $\text{Lp-PLA}_2$  proporsional dengan kadar lipoprotein yang memiliki apoB seperti LDL dan HDL, karena  $\text{LpPLA}_2$  yang tidak terikat apoB mudah terdegradasi.<sup>34</sup> Meskipun  $\text{Lp-PLA}_2$  aorta terus meningkat seiring meningkatnya jumlah sel busa namun setelah menghidrolisis oxPC, mengalami autoterdegradasi atau segera berdifusi kesirkulasi darah. Sehingga ketersediaan apoB LDL menjadi faktor pembatas keberadaan  $\text{Lp-PLA}_2$  di aorta, sehingga secara kuantitatif kadarnya di aorta kurang berkorelasi dengan sel busa.

Peningkatan kadar LDL sirkulasi meningkatkan jumlah LDL yang infiltrasi masuk ke jaringan endotel. Fosfatidilkolin merupakan senyawa fosfokolin yang banyak terdapat dalam lapisan luar lipoprotein LDL. Saat LDL di endotel, khususnya senyawa fosfokolin sangat berpotensi mengalami oksidasi sehingga terbentuk oxPC.<sup>23</sup> Saat LDL teroksidasi, enzim  $\text{LpPLA}_2$  menjadi aktif menghidrolisis oxPC menghasilkan senyawa bioaktif yaitu lisoPC dan oxFA. LisoPC menstimulasi endotel mengekspresi molekul adesi memfasilitasi migrasi monosit dari sirkulasi masuk ke jaringan dinding pembuluh darah dan berkembang menjadi makrofag.

Selain memacu endotel, lisoPC juga dapat menstimulasi monosit dan makrofag mensintesis enzim  $\text{Lp-PLA}_2$ . LisoPC memacu makrofag mensekresi sitokin inflamasi seperti  $\text{TnF-}\alpha$  dan  $\text{IL-1}\beta$ , selanjutnya sitokin ini sebagai autokrin memacu makrofag mensintesis enzim  $\text{Lp-PLA}_2$ .<sup>4</sup> LisoPC dapat

menstimulasi sel otot polos disekitarnya menghasilkan ROS sehingga semakin meningkatkan tingkat stress oksidasi. Peningkatan stress oksidasi dan inflamasi serta peningkatan kadar lipid dalam jaringan aorta akan semakin meningkatkan produksi LpPLA<sub>2</sub> sehingga kehadiran LpPLA<sub>2</sub> dan stress oksidasi menyebabkan umpan balik positif terhadap kadar LpPLA<sub>2</sub> dalam jaringan aorta maupun sirkulasi.

### Korelasi Variabel di Serum dengan Aorta dan korelasinya dengan Jumlah Sel Busa

Kadar MDA dalam jaringan aorta tidak berkorelasi dengan kadarnya dalam serum ( $r=0,12$ ;  $p>0,05$ ). Baik didalam aorta maupun didalam serum molekul MDA tidak stabil segera mengalami konversi menjadi 1,1,3,3-tetrametoksipropene atau 1,1,3,3-tetraetoksipropene.<sup>24</sup> Dengan demikian MDA dalam aorta merupakan senyawa peroksida yang dihasilkan dari oksidasi insitu asam arakidonat dari lipoprotein dalam sub endotel serta dari komponen membran sel penyusun jaringan pembuluh darah. MDA dalam serum berasal dari oksidasi AA di dalam lipoprotein.

Kadar F<sub>2</sub>Isp dalam jaringan aorta berkorelasi dengan kadarnya dalam serum ( $r=0,342$ ;  $p<0,05$ ). Ester F<sub>2</sub>-Isp yang terikat dimetabolisme menjadi F<sub>2</sub>-Isp bebas dan monoasil glicerol fosfat yang dilepas ke sirkulasi. Penurunan kadar F<sub>2</sub>-Isp dalam jaringan aorta diduga karena terjadi hidrólisis F<sub>2</sub>-Isp jaringan yang difasilitasi oleh hadirnya enzim Lp-PLA<sub>2</sub> yang meningkat di aorta sehingga F<sub>2</sub>-Isp bebas dilepas ke sirkulasi sehingga meningkatkan kadarnya dalam serum. Fluktuasi kadar dalam serum juga dapat disebabkan F<sub>2</sub>-Isp diekresikan lewat urin.<sup>25</sup> Pada aterogenesis fase awal kadar F<sub>2</sub>-Isp serum berkorelasi signifikan dengan kadarnya di aorta (Tabel 2), dan F<sub>2</sub>-Isp merupakan lipid peroksidasi yang stabil,<sup>35,36</sup> kadarnya di serum berkorelasi dengan jumlah sel busa, namun kadarnya masih terus meningkat sehingga kadar kadar F<sub>2</sub>-Isp serum kurang cukup alasan untuk digunakannya sebagai marker dini aterogenesis.

Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> di dalam aorta berkorelasi cukup besar dengan kadarnya di dalam serum ( $r=0,62$ ;  $p<0,01$ ) (Tabel 3). Hal ini disebabkan terjadinya difusi enzim diantara aorta dan serum. Dalam keadaan bebas tidak terikat, LpPLA<sub>2</sub> mudah mengalami autoterdegradasi.<sup>34</sup> Untuk kestabilan enzim Lp-PLA<sub>2</sub> diperlukan apoB lipoprotein sebagai *binding protein*. Dalam sirkulasi, 80% Lp-PLA<sub>2</sub> terikat apoB LDL dan 20% terikat apoB HDL.<sup>14</sup> LDL dalam jaringan

pembuluh darah pada akhirnya difagosit makrofag dan setelah difagosit Lp-PLA<sub>2</sub> dilepas sehingga dapat berdifusi ke sirkulasi dan dalam sirkulasi terikat apoB lipoprotein. Demikian juga LpPLA<sub>2</sub> hasil sintesis monosit dan makrofag, setelah disekresi ke luar sel, karena keterbatasan LDL bebas sebagai tempat terikatnya enzim, maka LpPLA<sub>2</sub> juga berdifusi ke sirkulasi. Karena keterikatannya dengan LDL itulah akhirnya LpPLA<sub>2</sub> dapat terbawa masuk kembali ke jaringan endotel pembuluh darah, sehingga terdapat korelasi sangat tinggi dengan kadarnya di jaringan aorta dan berkorelasi sangat signifikan dengan jumlah sel busa di aorta.

Jumlah sel busa diantara 3 waktu pengamatan yang berbeda menunjukkan perubahan mengikuti grafik regresi (Gambar 1). Lp-PLA<sub>2</sub> aorta maupun serum memiliki kenaikan kadar sangat signifikan, peningkatan tajam kadar Lp-PLA<sub>2</sub> terjadi antara lama konsumsi 2 mingguan lama konsumsi 8 minggu, kemudian stabil pada tahap berikutnya (12 minggu) (Gambar 1). Hal ini menunjukkan bahwa kadar LpPLA<sub>2</sub> telah mencapai kestabilan kadar sejak pengamatan 8 minggu. Fenomena serupa juga terjadi pada penelitian Shi *et al*<sup>8</sup> menggunakan hewan coba babi diabetes/hiperkolesterol, kadar LpPLA<sub>2</sub> serum pada penelitian ini meningkat tajam sejak pengamatan minggu ke 4 dan tetap tinggi tetapi tanpa peningkatan signifikan pada pengamatan 12 sampai 24 minggu. Adanya korelasi sangat signifikan antara kadar Lp-PLA<sub>2</sub> serum dengan jumlah sel busa dan peningkatan secara signifikan pada pemberian pakan jangka pendek 8 minggu, maka kadar enzim Lp-PLA<sub>2</sub> serum dapat dipakai sebagai indikasi proses aterogenesis yang sedang berlangsung di dalam jaringan pembuluh darah karena enzim Lp-PLA<sub>2</sub> melalui pembentukan lisoPC menjadi aktivator munculnya sebagian besar kondisi proaterogenik seperti stress oksidasi, disfungsi endotel, inflamasi dan perkembangan makrofag sel busa (Gambar 3). Dengan demikian Lp-PLA<sub>2</sub> serum merupakan *golden marker* aterogenesis dan sangat berpotensi digunakan sebagai kandidat untuk deteksi dini aterosklerosis.

### Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian ini adalah: (1) Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> aorta berkorelasi secara fungsional dengan jumlah sel busa melalui peningkatan stress oksidasi, hal ini didukung oleh adanya korelasi antara

kadar Lp-PLA<sub>2</sub> dengan kadar MDA dan MDA aorta berkorelasi sangat signifikan dengan jumlah sel busa. Hal ini menunjukkan bahwa enzim Lp-PLA<sub>2</sub> berperan sebagai aktivator pada pembentukan sel busa dengan menciptakan kondisi stress oksidasi. (2) Kadar F<sub>2</sub>-Isp di jaringan aorta berkorelasi dengan kadarnya di serum dan jumlah sel busa sedangkan kadar F<sub>2</sub>-Isp serum berkorelasi dengan jumlah sel busa. (3) Kadar Lp-PLA<sub>2</sub> serum berkorelasi baik dengan kadarnya di aorta maupun dengan jumlah sel busa, peningkatan kadar Lp-PLA<sub>2</sub> di aorta dan serum segera terjadi dan cepat mencapai kestabilan kadar yaitu saat mencapai sekitar 200 ng/mL pada pemberian pakan jangka pendek selama 8 minggu, sehingga kadar Lp-PLA<sub>2</sub> serum >200 ng/mL dapat digunakan sebagai kandidat *golden marker* terjadinya atherogenesis sejak dini.

## Daftar Pustaka

- Ballantyne, C.M., J.H. O'Keefe, A.M. Gotto, 2007. *Dyslipidemia Essentials*. Physician Press, New York. p. 1-63.
- Howlett, G.J., and K.J. Moore, 2006. Untangling the Role of Amyloid in Atherosclerosis. *Current Opinion Lipidology*. 17:541-547.
- Anand, D.V., A. Lahiri and D. Lipkin, 2003. EBCT coronary calcium imaging for the early detection of coronary artery disease in asymptomatic individuals, *J Cardiol*. 79: 10-17.
- Shi, Y., P. Zhang, L. Zhang, H. Osman, E.R. Mohler, C. Macphee, A. Zalewski, A. Postle, Wilensky, 2007. Role of Lipoprotein-associated Phospholipase A<sub>2</sub> in Leukocyte Activation and Inflammatory Responses. *Atherosclerosis* 191: 54-62.
- Moriarty and Gibson, 2005. Effect of Low Density Lipoprotein Apheresis on Lipoprotein Associated Phospholipase A<sub>2</sub>. *Am J Cardiol*. 95: 1246-1247.
- Noto, H., P. Chitkara, and P. Raskin, 2006. The Role of Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub> in the Metabolic Syndrome and Diabetes. *Journal of Diabetes and the Complication*. 20: 343-348.
- Gorelick, P.B., 2008. Lipoprotein Associated phospholipase A<sub>2</sub> and Risk of Stroke. *Am. J. Cardiol*. 101: 34F-40F.
- Filippatos, T.D., I.F. Gazi, V.G. Liberopoulos, M.S. Elisaf, A.D. Tselepis, And D.N. Kiortis, 2006. The Effect of Orlistat and Fenofibrate, alone or Combination, on Small dense LDL and Lipoprotein-associated Phospholipase A<sub>2</sub> in Obese patients with Metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 193:428-437.
- Winkler, K., M.M. Hoffmann, B.R. Winklmann, Friedrich I, G. Schafer, U. Seelhorst, B. Wellnitz, H. Wieland, B.O. Boehm, W. Marz, 2007. Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub> Predicts 5-Year Cardiac Mortality Independently of Established Risk Factors and Adds Prognostic Information in Patients with Low and Medium High-sensitivity C-Reactive Protein (The Ludwigshafen Risk and Cardiovascular Health Study), *Clinical Chemistry*. 53 1440-1447.
- Kametz, Y., Y. Kitagawa, S. Sekiyama, and S. Takagi, 2003. Increase in Plasma Malondialdehyde-modified low-density lipoprotein in patients with atherothrombotic cerebral infarction. *Tokyo J Exp Clin Med*. 30: 171-176.
- Reilly, M.P., D. Pratico, N. Delanty, G. DiMino, E. Tremoli, D. Rader, S. Kapoor, J. Rokach, J. Lawson, G. FitzGerald, 1998. Increased Formation of Distinct F<sub>2</sub> Isoprostanes in Hypertension. *Circulation*, 98: 2822-2828.
- Mogadam, R.A.P., A. Nermati, and A.N. Baghi, 2008. Serum MDA as Diagnostic's Biomarker in Stable Coronary Heart Disease. *Research Journal of Biological Sciences*. 3: 206-210.
- Brilakis E.S., J.P. McConnell, R.J. Lennon, A.A. Elesber, J.G. Meyer And P.B. Berger, 2004. Association of Lipoprotein-associated Phospholipase A<sub>2</sub> Level with coronary Artery Disease Risk Factors, Angiographic Coronary Artery Disease, and Major Adverse Event at Follow-up. *European Heart Journal*. 26:137-144.
- Iribarren, C., 2006. Lipoprotein-Associated Phospholipase A<sub>2</sub> and Cardiovascular Risk State of the evidence and Future Directions. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*. 26:5-6.
- Gustone, F. D., 1996. *Fatty Acid and Lipid Chemistry*. Blackie Academic & Professional, New York. p. 81.
- Halliwell, B., J.M.C. Gutteridge, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine* 3<sup>rd</sup> ed., Oxford University Press, New York.
- Rodriguez-Lee, M., G. Goran and G. Camejo, 2007. Fatty Acid-induced Atherogenic Changes in Extracellular, *Curr Opin Lipidol*. 18: 546-553.
- Denisov, E.T. and I.B. Afanasev, 2005. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*. Taylor & Francis Group. New York. p. 312.
- Stafforini, D., J.R. Sheller, T.S. Blackwell, A. Sapirstein, F.E. Yull, T.M. Mcientyre, J.V. Bonventre, S.M. Prescott, and L.J. Roberts, 2005. Release of F<sub>2</sub>-isoprostanes from Esterified Phospholipids Is Catalyzed by Intracellular and Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolases. *The Journal of Biological and Chemistry*. 28: 4616-4623.
- Oornii, K., P.T. Kovanen, 2006. Enhanced Extracellular Lipid Accumulation in Acidic Environment. *Curr Opin Lipidol* 17: 534-540.
- Jenner, A., M. Ren, R. Rejendran, P. Ning, B.T. Kwong, F. Watt and B. Halliwell, 2006. Zinc Supplementation Inhibit Lipid Peroxidation and The Development of Atherosclerosis in Rabbits fed a High Cholestreol Diet. *Free Radical Biology and Medicine*. Yong loo Linn School of Medicine Department of Biochemistry National University of Singapore. p. 1-23.



22. Elstad M.R., D.M. Stafforini, S.M. Prescott, T.M. McIntyre and Zimmerman. 1991. Human Macrophages Secrete Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase. *Chest* 99 9S-10S.
23. Liao, W., Liu, C., Wang, C. 2008. Detection of lipoprotein-associated phospholipase A2 using a nano-iridium particle catalyst-based biosensor, *Sensors and Actuators B* (134): 993-999.
24. Murray, R., D.K. Granner, And V.W. Rodwell, 2006. *Harper's Illustrated Biochemistry*. MC. Hill.
25. Devaraj S, S.V. Hirany, R.F. Burk, and I. Jialal, 2001. Divergence between LDL Oxidative Susceptibility and Urinary F<sub>2</sub>-isoprostanes as Measures of Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Clinical Chemistry*. 11:1974-1979.